پژوهش‌های حبوبات ایران
سال(دوره)۱۱ شمارهٔ۱، نیمهٔ اوّل ۱۳۹۹
صفحهٔ ۱۱۱-۱۰۰، نوع مقاله: پژوهشی

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 1, 2020, p. 100-111 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v11i1.73034

مطالعه تغییرات بیان ژن *CAT* و فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام عدس (*Lens culinaris* Medik) تحت تنش خشکی

منیژه رحیمی[1]، مهرآنا کوهی دهکردی[2*] و عبدالرزاق دانش شهرکی[2]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه علوم کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور؛
manijeh.rahimi89@gmail.com

۲- استادیار، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه علوم کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور

۳- استادیار تولید گیاهان زراعی، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد؛ ar_danesh2000@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۷

چکیده

گیاه عدس از جمله حبوبات باارزشی محسوب می‌شود که منبع مناسبی جهت تأمین پروتئین و اسیدهای آمینه می باشد. با توجه به بحران کم‌آبی و تأثیر آن به‌عنوان یک عامل محدودکننده در تولید محصولات زراعی از جمله عدس، شناسایی ارقام متحمل با بازده عملکرد مناسب ضروری به‌نظر می‌رسد. در شرایط تنش خشکی، سیستم علامت‌دهنده موجب القای ژن‌های مشخصی در مقابل اثرات زیان‌آور و تنش‌های محیطی می‌شود. کاتالاز از سری آنزیم‌های احیاکننده است که از سلول در برابر اثرات سمی پراکسید هیدروژن حمایت می‌کند. از این‌رو تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر تنش خشکی بر تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز و الگوی بیان ژن *CAT* در سه رقم عدس (کیمیا، گچساران و L7)، در دو مرحله رویشی و زایشی به‌صورت گلدانی با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. سطوح تنش خشکی شامل تیمار شاهد (بدون اعمال تنش خشکی)، تنش در مرحلهٔ رویشی و تنش در مرحلهٔ زایشی بود. تأثیر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو مرحلهٔ رویشی و زایشی معنی‌دار بود. در هر دو مرحله رشد، فعالیت آنزیم کاتالاز در رقمL7 بیشتر از سایر ارقام بود. بررسی الگوی بیان ژن*CAT* به روشReal time PCR انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که شرایط تنش منجر به افزایش بیان ژن مورد مطالعه شد؛ با این‌حال، افزایش بیان در ارقام مختلف متفاوت بود. بیان ژن*CAT* تحت اثر تنش خشکی در رقمL7 در هر دو مرحله رشد رویشی و زایشی نسبت به دو رقم دیگر افزایش بیشتری نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنش کم‌آبی، ضد اکسنده آنزیمی، qRT-PCR

مقدمه

عدس زراعی، گیاهی دیپلوئید (۲n=۱۴) از جنس *Lens*، گونه *culinaris* و متعلق به تیره لگومینوزه می‌باشد (Sharma & Chahota, 2004). عدس از قدیمی‌ترین منابع غذایی بشر به‌شمار می‌رود. منشأ آن خاک‌های حاصلخیز خاور نزدیک بوده و قدمت آن به شروع کشاورزی بازمی‌گردد. حدود ۲۵درصد نیاز پروتئینی روزانه مردم کشورهای درحال‌توسعه جهان از حبوبات تأمین می‌شود و با توجه به این‌که عدس دارای درصد قابل توجهی پروتئین بوده (حدود ۲۳درصد) و غنی از اسیدهای آمینه آلفا هیدروکسی اورنیتین، آلفا هیدروکسی آرژنین و هموآرژنین علاوه بر اسیدهای‌آمینه معمولی می‌باشد، به‌عنوان مکمل پروتئینی خوبی محسوب می‌گردد (Sulser & Sager, 1976). سطح زیرکشت عدس در سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵ در ایران ۱۳۱۴۵۴هکتار و تولید آن ۸۲۶۴۲تن بوده است که در بین حبوبات، پس از نخود دارای رتبه دوم می‌باشد. اردبیل، آذربایجان‌شرقی، لرستان، زنجان و فارس مهم‌ترین مراکز تولید عدس در ایران می‌باشند (Ministry of Agricultural Jahad, 2016).

خشکی، خطری جدی برای تولید موفقیت‌آمیز محصولات زراعی در سرتاسر جهان می‌باشد و تنش خشکی یکی از مهم ترین تنش‌های غیرزیستی است که به‌طور میانگین سبب کاهش۵۰درصدی عملکرد دانه گیاهان زراعی در جهان می‌شود (Heidari & Karami, 2014). کشور ما نیز با توجه به خصوصیات آب‌وهوایی و قرارداشتن بیش از نیمی از مساحت کشور در مناطق خشک و نیمه‌خشک، با کمبود آب در مناطق زیادی مواجه می‌باشد (Sabaghpour, 2006). تحقیقات انجام شده بر روی عدس نشان داده است که این گیاه در مرحله جوانه‌زنی نسبت به مراحل بعدی، حساسیت نسبتاً کمتری به

*نویسنده مسئول: m.koohi@gmail.com

تنش خشکی دارد. با وجود این، عدس در مراحل پیشرفته رشد نسبت به مراحل ابتدایی‌تر در برابر خشکی حساس‌تر است که نشان‌دهنده این است که اثرات تنش خشکی در طول دوره رشد گیاه تشدید می‌شود (De & Kar, 1995). دوره گلدهی، نیز حساس‌ترین مرحله فنولوژی عدس نسبت به تنش خشکی است؛ پس به نظر می‌رسد که انطباق این دوره با خشکی انتهای فصل علت اصلی کاهش عملکرد آن می‌باشد (Ganjali & Nezami, 2008).

در ایران و بسیاری از کشورهای مختلف جهان عده کثیری از مردم برای تأمین پروتئین مورد نیاز خود از حبوبات نظیر نخود، عدس و لوبیا استفاده می‌کنند و ازآنجاکه بخش عمدۀ کشور ایران دارای اقلیم خشک و نیمه‌خشک است، به‌دست آوردن لاین‌هایی با حداکثر عملکرد در شرایط کم‌آبی از مسائل مهم برای تحقیق در ایران به‌شمار می‌آید. بنابراین دستیابی به ژنوتیپ‌هایی که قادر به تحمل خشکی هستند، می‌توانند به میزان قابل‌توجهی از کاهش محصول بکاهد. در این راستا اصلاح و انتخاب ارقام عدس متحمل به خشکی با استفاده از شاخص‌های مناسبی که قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی هستند، همواره موردتوجه اصلاح‌کنندگان بوده است (Mostafaei, 2005).

از جمله رخدادهای مهم ناشی از تأثیر تنش‌های غیرزیستی و از آن جمله تنش خشکی، افزایش تجمع گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی[1] (ROS) است که شامل اکسیژن مولکولی (O_2)، سوپراکسیدازها، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال های هیدروکسیل هستند که منجر به واکنش‌های اکسیداتیو در سطح سلولی می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش داده و سبب واسرشت‌شدن پروتئین‌ها، آسیب به DNA و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (Torres-Franklin *et al*., 2008; De Carvalho *et al*., 2008).

گیاهان جهت مقابله با تنش اکساینده ناشی از رادیکال های فعال اکسیژن دارای مکانیسم‌های ضداکسنده آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشند. ضداکسنده‌های غیرآنزیمی شامل گلوتاتیون و اسیدهای آسکوربیک و ضداکسنده‌های آنزیمی، سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، آسکوربیت پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و پراکسیداز را شامل می‌شوند (Perl-Treves & Perl, 2002). مشاهده شده است که در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان متحمل بیش از گیاهان حساس است، از این رو به نظر می‌رسد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی دارای نقش مهمی می‌باشند (Heing *et al*., 2004; Guo *et al*.,2006) آنزیم کاتالاز از دسته پروتئین‌های آهن‌دار محسوب می‌شود. این آنزیم وقتی در سلول‌های گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در محیط زیاد باشد. کاتالاز از سری آنزیم‌های احیاکننده است که تبدیل پراکسیدهیدروژن به آب و مولکول اکسیژن را کاتالیز و از سلول در برابر اثرات سمی پراکسید هیدروژن حمایت می‌کند (Habibi *et al*., 2004). Sairam & Srivastava (2001) افزایش در میزان فعالیت کاتالاز را در شرایط تنش کمبود آب در هر دو گروه ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به خشکی گندم گزارش کرده و خاطرنشان نمودند نقش آنزیم‌های پاک‌کننده پراکسید هیدروژن مانند کاتالاز و گلوتاتیون ریداکتاز در افزایش تحمل به تنش خشکی بیشتر از آنزیم سوپر اکسید دسموتاز است. در آزمایشی با اعمال تنش خشکی بر گیاه سویا در مرحله گلدهی، گزارش شد میزان بیان ژن کاتالاز افزایش یافت. همچنین میزان کلروفیل برگ با میزان بیان ژن کاتالاز همبستگی منفی و معنی‌داری نشان داده است (Mazandarani *et al*., 2012). در تحقیقی اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت (کاتالاز و پراکسیداز) در ارقام مختلف عدس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در هر دو مرحلۀ رویشی و زایشی فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم محلی بیشتر از سایر ارقام بود و بالاترین مقاومت را نسبت به شرایط تنش از خود نشان داد (Allahmoradi *et al*., 2011).

مطالعۀ سازوکارها نشان داده است سیستم‌های منظم و پیچیده‌ای در پاسخ به تنش خشکی در گیاهان درگیر هستند. شناسایی ژن‌ها و مکانیسم‌های درگیر در آن‌ها تحت تنش‌های محیطی راهکارهای جدیدی برای زیست‌شناسان فراهم کرده است. محققان با انتقال این ژن‌ها به گیاهان حساس به تنش های محیطی توانسته‌اند گیاهان متحمل تولید نمایند. با ادامه این روند این احتمال می‌رود فرایندهای طولانی تولید لاین‌های مقاوم، کاهش یافته و دستیابی به ارقام و لاین‌ها با پتانسیل عملکرد مطلوب تسهیل شود. با توجه به مطالبی که ذکر شد، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر تنش خشکی بر تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز و بیان ژن *CAT* به‌عنوان ژن مرتبط با تنش خشکی در سه ژنوتیپ عدس (کیمیا، گچساران و L7) تحت شرایط تنش خشکی در مراحل رویشی و زایشی گیاه طراحی و اجرا شد.

---

۱. Reactive Oxygen Species

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال۱۳۹۶ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه پیام‌نور اصفهان انجام شد. فاکتورها شامل رقم، سه رقم عدس به نام‌های گچساران، کیمیا و L7 بودند که از ایستگاه تحقیقات کشاورزی دیم گچساران تهیه گردید (جدول۱). فاکتور دوم تنش خشکی در سه سطح شاهد، تنش خشکی در مرحلۀ ۴ تا ۵برگی (رویشی) و تنش خشکی در آغاز دورۀ گلدهی (زایشی) بود. با توجه به تعداد تیمارها و تکرارها در مجموع ۲۷گلدان تهیه شد. خاک موردنیاز جهت پرکردن گلدان‌ها و انجام آزمایش مخلوطی از خاک مزرعه، ماسه و کود حیوانی پوسیده به ترتیب به نسبت ۴، ۲ و ۱ بود. در این آزمایش از گلدان‌های پلاستیکی با رنگ تیره و زهکش مناسب با قطر ۲۰ و ارتفاع ۲۲سانتی‌متر استفاده گردید سپس هر گلدان با ۵کیلوگرم خاک تهیه شده، پُر شد.

جدول ۱- لیست ارقام عدس مورد مطالعه

Table 1. List of studied genotypes

رقم Cultivar	ژنوتیپ Genotype	شجره نامه Pedigree	مبدأ Origin
کیمیا (Kimia)	FLIP 92-12L	ILL 5582 × ILL 707	ICARDA
گچساران (Gachsaran)	ILL 6212	ILL 4349 × ILL 4605	ICARDA
ال ۷ (L7)	FLIP 2005-53L	ILL 7716 × ILL590	ICARDA

بذور قبل از کاشت با قارچ کش توپسین ام[1] ضدعفونی گردیدند. سپس ۱۵بذر در هر گلدان و در عمق حدود ۱سانتی‌متری کشت شد. بوته‌ها پس از سبزشدن طی دو مرحله تنک شدند و تراکم نهایی معادل ۵بوته در هر گلدان تنظیم شد. گلدان‌ها تا زمان اعمال تیمار تنش خشکی تا حد تأمین کامل نیاز آبی گیاه، به‌طور مرتب آبیاری شدند. پس از آن متناسب با نوع تیمار مورد نظر، تیمارهای تنش خشکی اعمال شد. اعمال تنش برای تیمارهای تنش در مرحله رویشی، از ظهور چهارمین برگ سه‌برگچه‌ای آغاز و نمونه‌برداری پس از سه نوبت آبیاری (۹روز بعد از اعمال تنش) انجام شد. اعمال تنش در مرحله زایشی نیز از مرحله تشکیل جوانه‌های گل آغاز و همانند تنش در مرحله رویشی نمونه‌برداری پس از سه نوبت آبیاری (۹روز بعد از اعمال تنش) صورت گرفت.

به‌منظور محاسبه میزان آب تیمارهای تنش، ابتدا حجم خاک گلدان‌ها محاسبه شد و میزان رطوبت قابل‌استفاده با توجه به ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی دائم که از نتایج آزمون خاک تعیین گردید، محاسبه شد. حد تخلیه مجاز برای عدس ۰/۵ درنظرگرفته شد (Farshi *et al*., 2003). سپس با درنظرگرفتن حد تخلیه مجاز ۵۰درصد، حد پایینی رطوبت سهل‌الوصل از رابطه۱ (Farshi *et al*., 2003) مشخص شد:

رابطه۱: $\Theta_{MAD} = \Theta_{FC} - (\Theta_{FC} - \Theta_{PWP}).MAD$

که در آن Θ_{FC} رطوبت حجمی در ظرفیت زراعی مزرعه (درصد)، Θ_{PWP} رطوبت حجمی در نقطه پژمردگی دائم (درصد) و MAD حد تخلیه مجاز می‌باشد. سپس برای تعیین عمق آبیاری و اعمال تنش خشکی، رطوبت خاک در تیمارهای شاهد با استفاده از دستگاه رطوبت‌سنج لترون به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد. زمانی که رطوبت خاک به حد پایینی رطوبت سهل‌الوصول (θ_{MAD}) رسید، عمق آب آبیاری بر اساس کمبود رطوبت خاک مطابق با رابطه۲ (Farshi *et al*., 2003) محاسبه و اعمال شد. میزان آب موردنیاز برای تیمارهای تحت‌تنش نیز با توجه به میزان آب تیمار شاهد اعمال گردید، یعنی تیمارهای تنش ۵۰درصد میزان آب مصرفی تیمار شاهد آب دریافت کردند. در رابطه زیر، d عمق آب موردنیاز (متر) و D عمق مؤثر ریشه گیاه (متر) می‌باشد.

رابطه۲: $d = (\Theta_{FC} - \Theta_{soil}).D$

نمونه‌برداری و استخراجRNA

جهت نمونه‌برداری، از بافت‌های جوان برگی استفاده شد. نمونه‌ها به میکروتیوب‌های عاری از ریبونوکلئاز انتقال یافته و برای استخراجRNA کل در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند. مراحل استخراج به‌وسیله کیت Total RNA isolation kit ساخت شرکت دنازیست، طبق روش ارائه‌شده توسط شرکت سازنده انجام شد. به‌منظور حذف احتمالی آلودگیDNA ژنومی از نمونه‌های استخراجیRNA، نمونه‌ها با استفاده از آنزیمDNaseI شرکت Fermentas، طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد تیمار قرار گرفتند.

تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده به روش طیف سنجی نوری[2] با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر BECKMAN مدل DU 530 انجام شد. به‌منظور تأیید کیفیت و کمیت نمونه‌های RNA استخراج‌شده، از الکتروفورز ژل آگارز یک‌درصد استفاده شد. عکس‌برداری ژل با دستگاه UV-transluminator Gel document مدلUniversal Hood II (ساخت شرکت BIO-RAD) در زیر پرتو فرابنفش با طول موج ۳۱۲nm و توسط نرم‌افزار Image Lab 4.0.1 انجام شد. مشاهده RNAهای ریبوزومی (18S و 28S) در محدوده ۲-۱ kb برای نمونه‌های RNA و عدم مشاهده حالت اسمیر روی ژل، به‌عنوان معیاری برای تعیین اسیدهای نوکلئیک با کیفیت بالا تلقی گردید.

1. Topsin M

2. Spectrophotometry

سنتز cDNA

سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت سنتز DNA، RB MMLV Reverse transcriptase ساخت شرکت زیست فن‌آوران رنا و طبق روش ارائه‌شده توسط شرکت سازنده انجام شد.

طراحی آغازگر واکنش Real Time PCR

با توجه به این‌که اطلاعات ژنوم گیاه عدس در بانک داده ژنومی موجود نبود، به‌منظور طراحی آغازگر، ابتدا گیاهانی که ژن‌های موردنظر در آن‌ها شناسایی شده بودند، مشخص گردید و گیاهانی که نزدیکی تاکسونومیکی بیشتری به گیاه عدس داشتند، انتخاب شدند. توالی ژن‌های موردنظر مربوط به گیاهان انتخابی، از پایگاه داده (NCBI)[1] استخراج شد و با استفاده از نرم افزارMEGA4 هم‌ردیف[2] شدند و سپس مناطق حفاظت‌شده این توالی‌ها برای طراحی آغازگر انتخاب شدند و به کمک نرم افزارOligo7 آغازگرهای رفت[3] و برگشت[4] برای ژن‌های موردنظر طراحی شد. ژن خانگی *Actin* به‌عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب و دو جفت آغازگر اختصاصی (Catalase) *CAT* و (Actin) *ACT* (جدول۲) جهت سنتز به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن *CAT* با استفاده از داده‌های Real time PCR

cDNA های مربوط به بافت برگ سه رقم گیاه عدس در شرایط شاهد و تنش در دو مرحله رویشی و زایشی، با سه تکرار آزمایشی و دو تکرار تکنیکی در واکنش‌های جداگانه با یک جفت آغازگر اختصاصی (*CAT*) و یک جفت آغازگر کنترل داخلی (*ACT*)، طبق برنامه حرارتی جدول۳ مورد آزمایش قرارگرفتند. اجزای واکنش به‌صورت مستر میکس سایبرگرین ۱۰میکرولیتر، آغازگر رفت و برگشت هر کدام ۱میکرولیتر و نمونه cDNA ۱میکرولیتر در حجم کل ۲۰میکرولیتر آماده شد و در استریپ‌های[5] مخصوص واکنش qPCR ساخت شرکت Applied Biosystem افزوده شد. در این واکنش از کیت RB SYBR qPCR حاوی SYBR® Green I Dye ساخت شرکت زیست‌فن‌آوران رنا استفاده شد. واکنش با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystem مدل Step One 48 well) به روش Comparative Ct (ΔΔCt) انجام گرفت.

چرخه آستانه (Ct) برای هر یک از نمونه‌ها توسط دستگاه تعیین شد و داده‌ها به روش کمیت‌سنجی نسبی توسط رابطه۳ نرمال‌سازی شدند (Pfaffl *et al*., 2002; Tichopad *et al*., 2004):

رابطه۳:
$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(control-sample)}}$$

در این رابطه، Ratio بیان کمی ژن می‌باشد که فاقد واحد است. E کارایی تکثیر، CT شماره چرخه آستانه تشخیص نور فلورسنت توسط دستگاه، Target ژن هدف، Ref ژن کنترل داخلی، $\Delta CP_{target\,(control-sample)}$: اختلاف بیان ژن بین نمونه شاهد و تیمار و $\Delta CP_{ref\,(control-sample)}$: اختلاف بیان ژن منبع بین نمونه شاهد و تیمار است.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Aebi (1984) اندازه‌گیری شد که براساس تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز بود. کاهش جذب پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰نانومتر و به‌مدت ۱دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (طیف‌سنج ماورای بنفش مرئی) مدل Shimadzu UV-2550 و به روش سینتیک[6] اندازه‌گیری شد. جهت تعیین مقدار حجم فعالیت از رابطه۴ استفاده شد. تعریف یک واحد، مقدار آنزیمی است که ۱میکرومول پراکسید هیدروژن را در هر دقیقه در pH=7 و دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد تجزیه می‌کند.

رابطه۴ (Maksimovic & Zivanovic , 2012):
$$Volume\ activity\left(\frac{Unit}{ml}\right) = \frac{\Delta A.V_q}{0.0436.V_s}$$

در این رابطه ΔA تفاوت میزان جذب نوری قرائت‌شده توسط دستگاه در ۱دقیقه، V_q حجم مخلوط واکنش در کووت، Vs حجم نمونه استفاده‌شده، 0.0436 ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن در طول‌موج ۲۴۰نانومتر (سانتی‌متر مربع/میکرومول) می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های واکنش Real time PCR با استفاده از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ و LinRegPCR انجام شد. همچنین به‌منظور تجزیه واریانس داده‌های سنجش مولکولی و فیزیولوژیکی تحت شرایط تنش و شاهد، از نرم افزار SAS نسخه ۸/۰ استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها به‌صورت برش‌دهی به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵درصد انجام شد (Soltani, 2006).

1. National Center for Biotechnology Information
2. Sequence Alignment
3. Forward primer
4. Reverse primer
5. Real time strips
6. Kinetics

جدول ۲- لیست آغازگرهای مورد استفاده
Table 2. List of used primers

آغازگر **Primer**	توالی آغازگر **Primer sequence** **(5'→3')**	طول قطعه نوکلئوتید **Product size** **(bp)**	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) **Annealing temperature** **(˚C)**
ACT-F *ACT-R*	TGGCCGTACAACTGGTATTG GCTCTGCAGATGTGGTGAA	182	54
CAT-F *CAT-R*	CCAACCACAGCCATGCCACT AGGACCAAGCGACCAACAGG	187	56

جدول ۳- شرایط واکنش Real time PCR
Table 3. Real time PCR condition

مرحله واکنش **Step**	تعداد چرخه **Cycle**	درجه‌حرارت (درجه سانتی‌گراد) **Temperature (˚C)**	زمان (ثانیه) **Time (sec)**
واسرشت اولیه Initialization	1	95	180
واسرشت Denaturation	40	95	20
اتصال Annealing		55	30
گسترش Extension		72	30
نمودار ذوب Melt curve	1	95 60 0.3 + 95	15 60 - 15

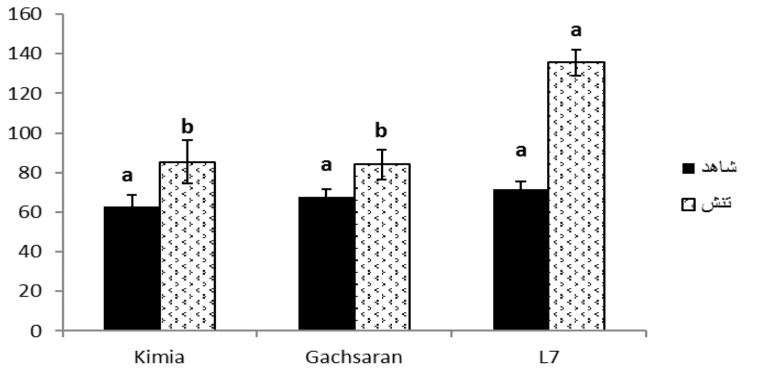
نتایج و بحث

تأثیر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام عدس

در این تحقیق بین ارقام عدس موردمطالعه در تیمار شاهد (بدون تنش خشکی) از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با اعمال تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هر سه رقم افزایش نشان داد، به‌طوری‌که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم L7 به میزان ۱۳۵/۵۶واحد (دو برابر میزان آن در شرایط شاهد) مشاهده شد. ارقام کیمیا و گچساران به ترتیب با فعالیت ۸۵/۲۷ و ۸۴/۱۵واحدی آنزیم کاتالاز اختلاف معنی‌دار با رقم L7 نشان دادند (شکل ۱).

فعالیت بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در واکنش به تنش خشکی افزایش می‌یابد (Manivannan *et al.*, 2007). نتایج به‌دست‌آمده در مورد چندین رقم حساس و مقاوم به خشکی گندم نشان می‌دهد که احتمالاً خشکی می‌تواند یکی از عوامل مؤثر در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باشد. همچنین مشخص شده است فعالیت آنزیم‌های (کاتالاز و سوپر اکسید دسموتاز) تحت شرایط تنش کمبود آب در ارقام مقاوم به خشکی گندم در مقایسه با ارقام حساس افزایش بیشتری را نشان می‌دهد (Lascano *et al.*, 2005). در این تحقیق به‌نظر می‌رسد هرچند تنش خشکی موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هر سه رقم مورد بررسی گردید، اما اختلاف بین ارقام از نظر درصد افزایش فعالیت کاتالاز در شرایط تنش در مقایسه با شرایط شاهد، نمایانگر تفاوت ارقام مورد بررسی از لحاظ توانایی آنها جهت مقابله با صدمات اکسیداتیو است. البته قابل ذکر است که گزارش‌ها در مورد تأثیر تنش‌های مختلف بر روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز متفاوت است. افزایش، کاهش و یا عدم تغییر در فعالیت کاتالاز تحت شرایط تنش خشکی نیز مشاهده شده است (Liu & Huang, 2000).

Sairam & Srivastava (2001) افزایش در میزان فعالیت کاتالاز را در شرایط تنش کمبود آب در هر دو گروه ژنوتیپ های حساس و مقاوم به خشکی گندم گزارش کرده و خاطرنشان نمودند که نقش آنزیم‌های پاک‌کننده پراکسید هیدروژن مانند گلوتاتیون رداکتاز و کاتالاز در افزایش تحمل به تنش خشکی بیشتر از آنزیم سوپر اکسید دسموتاز است.



شکل۱- تاثیر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام مختلف عدس

ستون‌های دارای حروف متفاوت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P< 0.05)

Fig. 1. Effect of drought stress on catalase activity in different lentil cultivars

Columns with different letters show statistically significant difference (P< 0.05).

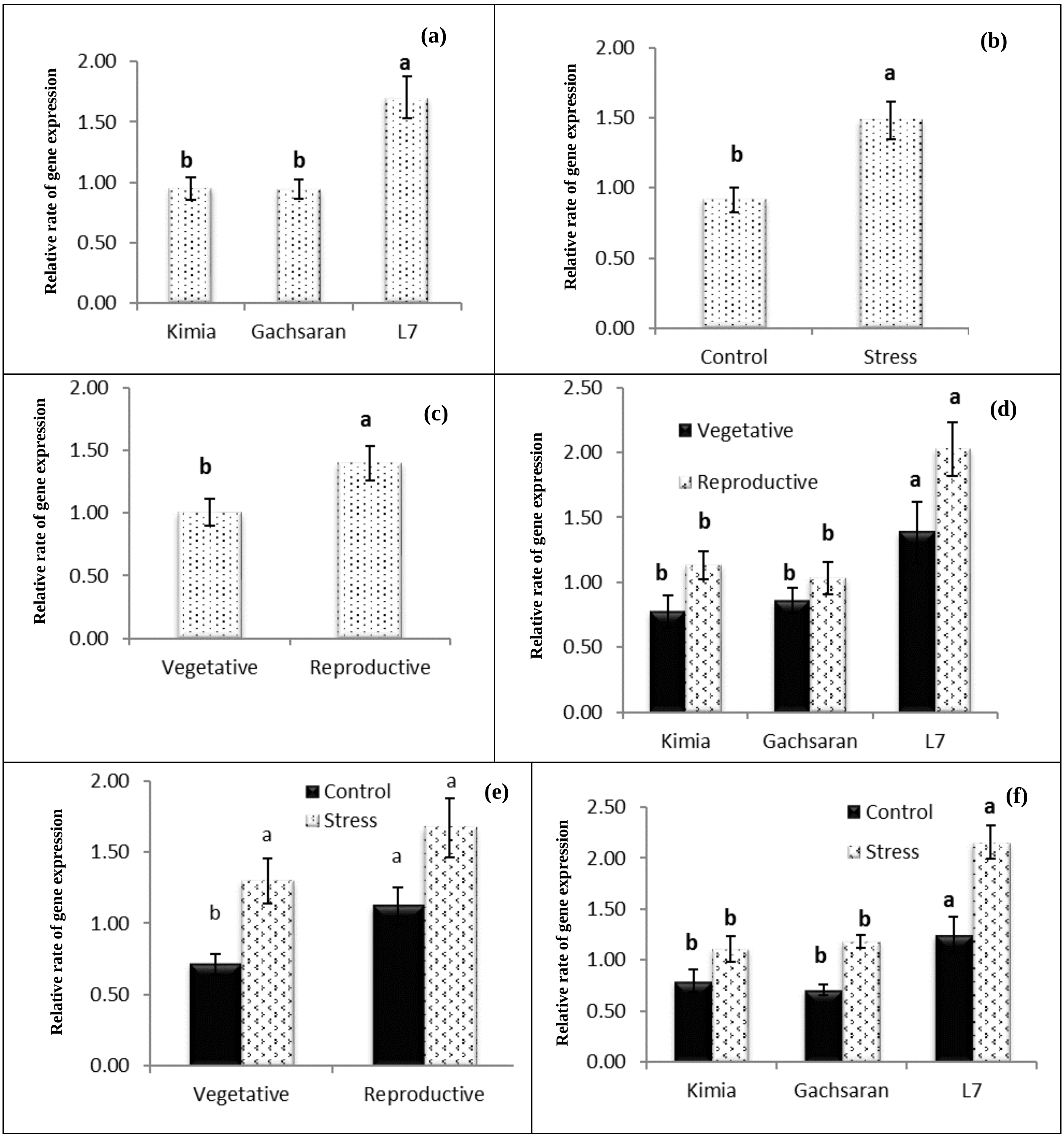
بررسی بیان ژن کاتالاز (*CAT*) در ژنوتیپ‌های عدس در پاسخ به تنش خشکی در دو مرحله رویشی و زایشی

بررسی بیان ژن*CAT* در برگ نمونه‌های موردمطالعه نشان‌دهنده اثر معنی‌دار رقم، مرحله رشد و تنش خشکی بر میزان بیان ژن بود. همچنین اثر متقابل رقم در مرحله رشد و رقم در تنش بر میزان بیان ژن*CAT* معنی‌دار شد (جدول ۴). بین ارقام مورد مطالعه ازنظر میزان بیان ژن*CAT* اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به‌طوری‌که رقمL7 با ۱/۷ بیشترین میزان بیان ژن و ارقام کیمیا و گچساران به ترتیب با ۰/۹۵ و ۰/۹۴ کمترین میزان بیان ژن را به خود اختصاص دادند (شکل۲-a).

با توجه به شکل۲-b میزان بیان ژن پس از اعمال تنش خشکی افزایش معنی‌داری در حدود ۱/۶برابر نسبت به نمونه شاهد (بدون تنش خشکی) داشت. بررسی بیان ژن*CAT* در برگ گیاهان مورد مطالعه نشان داد بیان این ژن در مرحلۀ زایشی نسبت به مرحلۀ رویشی به میزان ۰/۳۹ افزایش یافته است (شکل۲-c). با توجه به شکل۲e هرچند افزایش میزان کاتالاز در هر دو مرحله رویشی و زایشی در شرایط تنش نسبت به شاهد مشاهده می‌شود، اما میزان این افزایش در مرحله زایشی بیشتر از مرحله رویشی می‌باشد. حساسیت بیشتر گیاه عدس در مرحله گلدهی و پُرشدن دانه نسبت به تنش خشکی در نتایج تحقیقات (Mishra *et al*, 2016)، Mishra *et al*, (2014) و Shrestha *et al*, (2006a) گزارش شده است. مقایسه ارقام عدس مورد مطالعه، از نظر میزان بیان ژن*CAT*، در دو مرحلۀ رویشی و زایشی نشان داد که در هر دو مرحله رشد رویشی و زایشی، رقمL7 به ترتیب با ۱/۳۹ و ۲/۰۲ بیشترین میزان بیان ژن را در بین ارقام داشت. ارقام گچساران و کیمیا در هر دو مرحله با اختلاف معنی‌دار در رتبۀ بعدی قرار گرفتند (شکل۲- d).

با بررسی اثر متقابل تنش خشکی با رقم مشاهده شد که در بین ارقام مورد مطالعه با اعمال تنش خشکی بیشترین افزایش میزان بیان ژن*CAT* به رقمL7 مربوط می‌شود، به‌طوری‌که در شرایط تنش نسبت به شاهد (بدون تنش) میزان بیان ژن، ۱/۷برابر افزایش داشت (شکل۲- f). با توجه به شکل۲-f مشاهده می‌شود در شرایط شاهد و تنش ازنظر میزان بیان ژن، بین ارقام گچساران و کیمیا اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، درحالی‌که در هر دو شرایط شاهد و تنش، رقمL7 با اختلاف معنی‌دار در رتبۀ نخست قرار دارد.

در تحقیقی که به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن کاتالاز در سه رقم گندم، در پاسخ به تنش خشکی در چهار سطح شامل ۰/۳-، ۰/۹-، ۸- و ۱۲- بار انجام شد و سه رقم زاگرس (متحمل)، مغان (نیمه متحمل) و تجن (حساس) مورد بررسی قرار گرفت، بیان ژن کاتالاز تا تیمار ۸-بار افزایش و پس از آن در تیمار ۱۲-بار کاهش معنی‌داری در تمام ارقام به‌ویژه رقم تجن نشان داد. بیشترین بیان در تیمار ۰/۹-بار خشکی و در رقم زاگرس ملاحظه شد، درحالی‌که در رقم مغان حداکثر سطح رونوشت‌برداری در تیمار ۸-بار حاصل گردید. به‌طور کلی فعالیت ژن کاتالاز با افزایش شدت تنش، افت چشمگیری نشان داد، با این حال سطوح میانی تنش سبب تحریک فعالیت ژن موردمطالعه گردید (Moloudi *et al*., 2013). بررسی الگوی بیان ژن*CAT* در ارقام حساس و متحمل به خشکی سویا نیز با استفاده از PCR در زمان واقعی، نشان داد بیان ژن*CAT* در تنش خشکی در رقم متحمل حدود دو برابر رقم حساس بود (Ahmadi & Soleimani, 2015) که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت دارد.



شکل ۲- مقایسه میزان بیان ژن *CAT* در a: سه رقم عدس، b: دو سطح تنش و عدم تنش خشکی، c: دو مرحله رویشی و زایشی، d: اثر متقابل ژنوتیپ×مرحله رشد، e: اثر متقابل مرحله رشد×تنش و f: اثر متقابل ژنوتیپ×تنش

ستون‌های دارای حروف متفاوت از لحاظ آماری، اختلاف معنی‌داری دارند (P< 0.05).

Fig. 2. The comparison of CAT gene expression in a: three cultivars of lentil, b: stress and non-drought stress, c: vegetative and reproductive, d: genotype×growth stage, e: growth stage×stress, and f: genotype×stress

Columns with different letters show statistically significant difference (P< 0.05).

جدول۴- تجزیه واریانس بیان ژن کاتالاز در ارقام عدس

Table 4. Analysis of variance of *CAT* gene expression in lentil cultivars

منابع تغییر **Source of variation**	درجه آزادی **df**	میانگین مربعات **Means of squares**
رقم Cultivar	2	2.278**
تنش Stress	1	2.896**
مرحله‌ی رشد Growth stage	1	1.373**
رقم × تنش Genotype × Stress	2	0.283**
رقم × مرحله‌ی رشد Genotype × Growth stag	2	0.163*
تنش × مرحله‌ی رشد Stress× Growth stage	1	0.002 n.s.
رقم × تنش × مرحله‌ی رشد Genotype× Stress× Growth stage	2	0.016 n.s.
خطا Error	24	0.041
ضریب تغییرات CV (٪)	-	16.92

**، * وns : به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد و ۵درصد و اختلاف غیرمعنی‌دار

**, *: Significantly different at a=0.05 and a=0.01 probability levels, respectively; ns: non-significant

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر، در هر سه رقم عدس، میزان بیان ژن مورد مطالعه، همبستگی بالایی با نتایج فیزیولوژیکی نشان داد. بر این اساس می‌توان نتیجه گیری نمود که بین فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام عدس مورد مطالعه در شرایط شاهد و تحت تنش و میزان بیان ژن*CAT* هماهنگی وجود داشته است. با توجه به آن‌که بیان این ژن در گونه‌های زراعی دیگر سبب مقاومت به خشکی گردیده است، انتظار می‌رود در ارقام با افزایش بیان بیشتر در طی تنش خشکی، مقاومت بیشتری مشاهده گردد. بررسی اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحلۀ رویشی و زایشی ارقام عدس مورد مطالعه نیز نشان داد که در هر دو مرحله رشد در ارقام عدس مورد مطالعه، تنش خشکی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود. تحت شرایط تنش، رقمL7 در هر دو مرحلۀ رویشی و زایشی نسبت به دو رقم دیگر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتری نشان داد. به‌نظر می‌رسد که بالابودن فعالیت آنزیم کاتالاز بتواند سبب ایجاد مقاومت احتمالی در این ارقام گردد. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، به‌نظر می‌رسد رقمL7 نسبت به ارقام کیمیا و گچساران از تحمل‌پذیری بیشتری نسبت به تنش خشکی برخوردار باشد، هرچند تأیید این موضوع به بررسی تحمل‌پذیری این گیاه به تنش خشکی در شرایط مزرعه‌ای نیازمند است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاران پردیس تحقیقات و آموزش کشاورزی گچساران به‌ویژه جناب آقای دکتر کریمی‌زاده که در تأمین بذور ارقام مورد مطالعه همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Aebi, H. 1984. Catalase *in Vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126.
2. Ahmadi, J., and Soleimani, V. 2015. The Expression profile of *OSBP*, *CAT* and *BZIP* genes in drought tolerant and susceptible soybean cultivars using real time PCR. Agricultural Biotechnology 6(3):1-16 (In Persian with English Summary).
3. Allahmoradi, P. 2011. The Reaction of antioxidants of lentil (*Lens culinaris* Medik) cultivars in response to drought stress. MSc. Thesis. Razi University, Iran (In Persian).

4. De Carvalho, M.H.C., and Contour-Ansel, D. 2008. (h)GR, beans and drought stress. Plant Signaling & Behavior 3(10): 834-835.
5. De, R., and Kar, R.K. 1995. Seed germination and seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*) under water stress induced by PEG-6000. Seed Science Technology 23: 301-308.
6. Farshi, A., Siadat, H., Darbandi, S., Ansari, M., Kheirabi, J., Mirlatifi, M., Salamat, A., and Sadat-Miri, M.H. 2003. Irrigation Water Management on the Farm. First Edition. Iranian National Irrigation and Drainage Committee Publishers. p. 187. (In Persian).
7. Ganjeali, A., and Nezami, A. 2008. Ecophysiology and Limiting the Yield of Beans. Mashhad University Jihad Publishers. p. 500. (In Persian).
8. Guo, Z., Ou, W., Lu, S., and Zhong, Q. 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiology and Biochemistry 44: 828-836.
9. Habibi, D., Boojar, M.M., Mahmoudi, A., Ardakani, M.R., and Taleghani, D. 2004. Antioxidative Enzymes in sunflower subjected to drought stress. In 4th International Crop Science Congress, September 2010, Australia. p.1-4.
10. Heidari, M., and Karami, V. 2014. Effects of different mycorrhiza species on grain yield, nutrient uptake and oil content of sunflower under water stress. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 13: 9-13.
11. Hieng, B., Ugrinovic, K., Sustar-Vozlic, J., and Kidric, M. 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology 161(5): 519-530.
12. Lascano, H.R., Antonicelli, G.E., Luna, C.M., Melchiorre, M.N., Gomez, L.D., Racca, R.W., Trippi, V.S., and Casano, L.M. 2005. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. Australian Journal of Plant Physiology 28: 1095-1102.
13. Liu, X., and Huang, B. 2000. Heat stress injuey in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. Crop Science 40: 503-510.
14. Maksimović, J.J.D., and Živanović, B.D. 2012. Quantification of the antioxidant activity in salt-stressed tissues. In: Plant Salt Tolerance Humana Press, Totowa, NJ. p. 237-250.
15. Manivannan, P., Jaleel, C.A., Kishorekumar, A., Sankar, B., Somasundaram, R., Sridharan, R., and Panneerselvam, R. 2007. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. by propiconazole under water deficit stress. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 57(1): 69-74.
16. Mazandarani, A., Rahim-Malek, M., Navvabpur, S., and Ramazanpur, S.S. 2012. Catalase gene expression under drought stress at flowering stage in soybean cultivars. 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Congress. September 3-5, 2012. Ferdowsi University Mashhad, Iran. p. 312. (In Persian).
17. Ministry of Agricultural Jahad. 2016. Agricultural Products Statistics. p. 117. (In Persian).
18. Mishra, B.K., Srivastava, J.P., and Lal, J.P. 2014. Drought stress resistance in two diverse genotypes of lentil (*Lens culinaris* Medik.) imposed at different phenophases. Journal of Food Legumes 27(4): 307-314.
19. Mishra, B.K., Srivastava, J.P., Lal, J.P., and Sheshshayee, M.S. 2016. Physiological and biochemical adaptations in lentil genotypes under drought stress. Russian Journal of Plant Physiology 63(5): 695-708.
20. Moloudi, F., Navabpour, S., Soltanloo, H., Ramazanpour, S.S., and Sadeghipour, H. 2013. Catalase and Metallothionein genes expression analysis in wheat cultivars under drought stress condition. Journal of Plant Molecular Breeding 1(2): 54-68. (In Persian with English Summary).
21. Mostafaei, A. 2005. Theoretical and Practical Electrophoresis of Protein in the Gel. Yadavaran Publishers. p. 184. (In Persian).
22. Perl-Treves, R., and Perl, A. 2002. Oxidative stress: an introduction. Oxidative Stress in Plants p. 1-32.
23. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 30(9): 36-36.
24. Sabaghpoar, S.H. 2006. Parameters and Mechanisms if Drought Tolerance in Crops. Natonal Committee of Agriculture Aridity and Drought Management 145 p.
25. Sairam, R.K., and Srivastava, G.C. 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. Journal of Agronomy and Crop Science 186(1): 63-70.
26. Sharma, S.K, and Chahota, R. 2004. Current status of interspecific hybridization in geneus lens. Journal of Lentil Research 1: 15-18.

27. Shrestha, R., Turner, N.C., Siddique, K.H.M., Turner, D.W., and Speijers, J. 2006a. A water deficit during pod development in lentils reduces flower and pod numbers but not seed size. Australian Journal of Agricultural Research 57: 427-438.
28. Soltani, A. 2006. Revision of the Application of Statistical Methods in Agricultural Research. Mashhad University Jihad Publications. p. 74. (In Persian).
29. Sulser, H., and Sager, F. 1976. Identification of uncommon amino acids in the lentil seed (*Lens culinaris* Med.). Experientia 32(4): 422-423.
30. Tichopad, A., Didier, A., and Pfaffl, M.W. 2004. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue specific contaminants. Molecular and Cellular Probes 18: 45-50.
31. Torres-Franklin, M.L., Contour-Ansel, D., Zuily-Fodil, Y., and Pham-Thi, A. T. 2008. Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. Journal of Plant Physiology 165(5): 514-521.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 1, 2020, p. 100-111 (Research Article)

Changes in *CAT* gene expression of and catalase enzyme activity under drought stress in lentil (*Lens culinaris* Medik) cultivars

Rahimi[1], M., Koohi Dehkordi[2*] M. & Danesh Shahraki[3], A.

1. MSc., Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University; manijeh.rahimi89@gmail.com
2. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Sciences, College of Agriculture, Payame Noor University
3. Assistant Professor, Department of Agronomy, College of Agriculture, Shahrekord University; ar_danesh2000@yahoo.com

Received: 11 June 2018
Accepted: 18 September 2018

DOI: 10.22067/ijpr.v11i1.73034

Introduction

Lentil is one of the oldest sources of human food. Since around 25% of the daily protein requirement of the developing world's peoples comes from legumes, considering to significant percentage of protein (about 23%) and high amino acids content of alpha-hydroxy- ornitin, alpha-hydroxy-arginine and hemoarginine in addition to ordinary amino acids in lentils, this plant commonly known as good protein supplements. Drought stress as one of the most important non-biological stresses causes an average of 50% reduction in crop yield in the world. In Iran is also faces a shortage of water in many areas due to climate characteristics and more than half of the country's land are in arid and semi-arid areas. Research on lentil has shown that this plant is more sensitive to drought during advanced stages of growth than the early stages, and it seems that the adaptation of this period to the end of the season is the main cause of its reduced yield. Therefore, achieving genotypes that are able to resist drought condition can significantly prevent crop yields. It has been observed that, under drought stress conditions, the activity of antioxidant enzymes in tolerant plants is much higher compare to sensitive plants. It seems antioxidant enzymes have an important role in tolerance to drought stress. Therefore, in this study, the effects of drought stress on catalase enzyme activity and *CAT* gene expression pattern in three lentil cultivars (Kimia, Gachsaran and L7) in both stages of vegetative and reproductive were studied.

Materials & Methods

The experiment was performed in a completely randomized design with three replications for three levels of drought stress (without drought stress, stress in the vegetative stage and stress in the reproductive stage) and analyzed in factorial experiment. Young leaf tissues were used for RNA extraction, samples were transferred to ribonuclease free microtubules and stored at 80°C. The total RNA extraction was performed using the Denazist Total RNA isolation kit. To eliminate the possible contamination of the genomic DNA from extracted RNA samples, the samples were treated with DNaseI enzyme. An agarose gel electrophoresis was used to confirm the quality and quantity of RNA samples. Synthesis of the first strand of cDNA was performed using DNA synthesis kits, RB MMLV Reverse Transcriptase, manufactured by RNA Biotechnology Company. Two specific primers CAT (Catalase) and ACT (Actin) (internal control gene) were used to analyses the gene expression. In this reaction, the RB SYBR qPCR kit containing SYBR® Green I Dye was used manufactured by RNA Biotechnology Company. The reaction was carried out using Thermocycler Applied Biosystem, Model Step One 48 well by Comparative Ct (ΔΔCt) method and according to the methodology presented by the manufacturer. The threshold cycle (Ct) for each sample was determined by the device, then the data were analyzed by relative quantitative method by Pfaffl *et al*. (2002). The activity of catalase enzyme was measured by Aebi (1984) method. Analysis of Real Time PCR data was performed using Excel and LinRegPCR softwares. The SAS software was used to analyze the variance of the data. Comparison of the averages was performed using the least significant difference (LSD) method at the 5% probability level.

[*]**Corresponding Author:** m.koohi@gmail.com

Results & Discussion

Based on the obtained result, there was no significant difference between the cultivars of lentil in control treatment (no drought stress) for catalase activity. By applying drought stress, the activity of catalase enzyme increased in all three cultivars. The highest activity of catalase was observed in L7 (Twice as much as the control) and Kimia and Gachsaran cultivars were significantly different from the L7 cultivar. Significant differences were observed between the cultivars in *CAT* gene expression. The L7 cultivar with 1.7 showed the highest gene expression and Kimia and Gachsaran cultivars had the lowest *CAT* gene expression with 0.95 and 0.94, respectively. Gene expression level at reproductive stage was increased to 0.39 in compared to vegetative stage. Drought stress increased the *CAT* gene expression significantly (about 1.6 times of control). In both vegetative and reproductive stages, L7 cultivar had the highest gene expression with rate of 1.39 and 2.2, respectively. Investigating the interaction of drought stress with cultivar showed that there was no significant difference between Gachsaran and Kimia cultivars in control and stress conditions in terms of gene expression level, while in both control and stress conditions, L7 cultivar showed the significant difference.

Conclusion

Based on the results of this study, in all three lentil cultivars, the gene expression pattern showed high correlation with physiological results. Due to the fact that expression of *CAT* gene in other cultivars causes drought resistance, it is expected that more resistance will be observed in the cultivars by increasing the expression during drought stress. Under stress conditions, L7 cultivar showed higher catalase activity in both vegetative and reproduction stages than the other two cultivars. Therefore, it seems that L7 cultivar is more tolerant to drought stress than Kimia and Gachsaran cultivars.

Keywords: Antioxidant enzyme, Dehydration stress, qRT-PCR